

A1

**DEMANDE  
DE BREVET D'INVENTION**

(21)

**N° 81 10136**

---

(54) Perfectionnement à un procédé de détermination d'un constituant dans un échantillon.

(51) Classification internationale (Int. Cl. <sup>3</sup>). G 01 N 31/22, 33/02, 33/48.

(22) Date de dépôt..... 21 mai 1981.

(33) (32) (31) Priorité revendiquée : Japon, 21 mai 1980, n° 55-68245.

(41) Date de la mise à la disposition du  
public de la demande..... B.O.P.I. — « Listes » n° 48 du 27-11-1981.

---

(71) Déposant : TOYO JOZO KABUSHIKI KAISHA, résidant au Japon.

(72) Invention de : Kunio Matsumoto et Rokuro Izumi.

(73) Titulaire : *Idem* (71)

(74) Mandataire : Cabinet Regimbeau, Corre, Martin et Schrimpf,  
26, av. Kléber, 75116 Paris.

La présente invention concerne un perfectionnement à un procédé de détermination d'un constituant dans un échantillon, dans lequel l'échantillon contient une substance mélangée qui influe sur la détermination pour causer une erreur, procédé selon lequel on soumet à une transformation la substance soumise à la détermination dans une détermination de constituant dans un échantillon de manière à former une deuxième substance et on oxyde cette deuxième substance en utilisant une oxydase correspondante, le perfectionnement étant caractérisé en ce qu'on phosphoryle la deuxième substance mélangée dans l'échantillon par une kinase immobilisée correspondante pour la deuxième substance mélangée et ATP ; on transforme la substance, on oxyde la deuxième substance ainsi formée en utilisant une oxydase correspondante et on mesure l'oxygène consommé ou l'eau oxygénée produite dans une réaction.

L'analyse enzymatique a été couramment utilisée dans une détermination quantitative et l'analyse d'un constituant dans un échantillon. Toutefois, l'analyse enzymatique est peu économique en raison de l'utilisation d'une grande quantité d'enzyme coûteuse. Elle est désavantageuse aussi en raison de sa mise en oeuvre compliquée, de la longue durée de la détermination et de la labilité de l'enzyme.

Pour amélioration, on a utilisé une enzyme immobilisée, spécialement par combinaison avec un moyen de mesure électrochimique appelé électrode à enzyme. Le procédé de détermination utilisant une électrode à enzyme présente un certain nombre d'avantages, par exemple il est simple à mettre en oeuvre, exige des quantités moindres de réactifs, la durée de la détermination est plus courte et on consomme moins d'enzyme. De nombreuses électrodes à enzyme ont été mentionnées et on s'y est intéressé spécialement dans le domaine de la biochimie clinique. De plus, l'électrode à enzyme est devenue d'usage courant pour analyse de matières de départ, de produits et de compositions dans les domaines de la fermentation, de l'alimentation et d'autres. On a

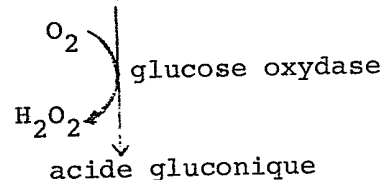
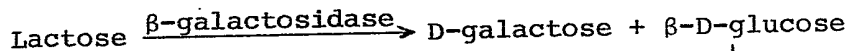
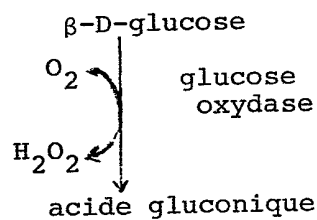
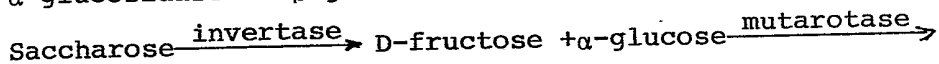
noté beaucoup d'applications pour des mesures dans des procédés de fermentation et pour contrôle de la qualité dans les industries de la fermentation et de l'alimentation.

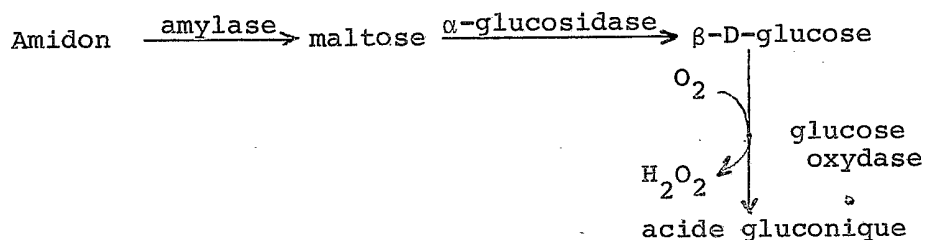
5 Dans l'industrie de la fermentation, pour une culture appropriée de champignons ou de levures et une plus forte productivité, une mesure précise et rapide du saccharose dans un milieu est nécessaire.

10 Egalement dans l'industrie alimentaire, le contrôle de qualité de produits laitiers contenant du saccharose et du lactose exige une analyse rapide et précise de ces sucres.

15 Dans une biochimie clinique, on effectue par exemple une détermination d'activité d'amylase en hydrolysant de l'amidon comme substrat en maltose, puis on hydrolyse le maltose en hexose, et donc il faut que l'on mesure rapidement et avec précision le maltose et l'hexose.

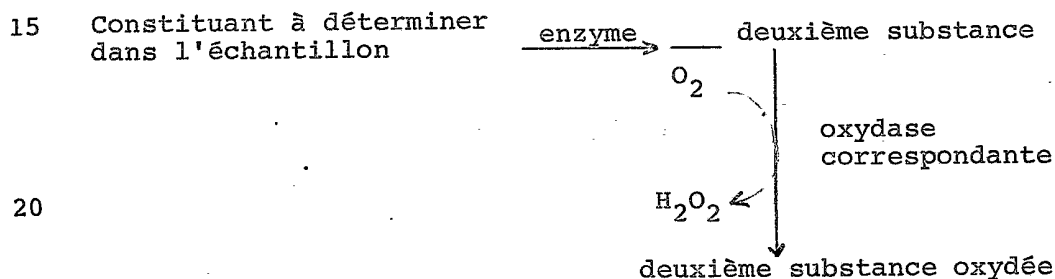
20 On donne ci-dessous des exemples de déterminations de saccharose, de lactose, de maltose et d'activité d'amylase ainsi que d'activité d'invertases du même genre,  $\alpha$ -glucosidase ou  $\beta$ -galactosidase.





Dans ces systèmes de réaction, du glucose est formé par action de mutarotase, de  $\beta$ -galactosidase ou d' $\alpha$ -glucosidase, et le glucose est oxydé par la glucose oxydase pour mesure de la quantité d'oxygène consommé ou d'eau oxygénée produite, fournissant ainsi une mesure de chaque constituant à déterminer.

En général, la détermination d'un constituant dans un échantillon est effectuée comme suit.



Selon ce schéma de réaction, on détermine une activité d'enzyme ou un constituant dans un échantillon en utilisant l'oxydase de la deuxième substance (oxydase correspondante pour la deuxième substance).

Les autres exemples de la série de réactions ne sont pas limités à l'analyse ci-dessus de substances apparentées aux sucres.

Des exemples sont les suivants.

- 30 (1) A déterminer : phospholipide, phosphorylcholine, activité de phospholipase D, phosphatase ;  
deuxième substance : choline ;  
oxydase : choline oxydase ;  
mesure : oxygène consommé ou eau oxygénée produite.

(2) A déterminer : graisse neutre, activité de lipase, de lipoprotéine lipase ;

deuxième substance : glycérol ;

oxydase : glycérol oxydase ;

5 mesure : oxygène consommé ou eau oxygénée produite.

(3) A déterminer : activité de leucine aminopeptidase, substrat synthétique contenant un amino-acide ;

deuxième substance : amino-acide ;

10 oxydase : amino-acide oxydase ;

mesure : oxygène consommé ou eau oxygénée produite.

(4) A déterminer : acide lactique, activité de lactate déshydrogénase (LDH) ;

deuxième substance : acide pyruvique ;

15 oxydase : pyruvate oxydase ;

mesure : oxygène consommé ou eau oxygénée produite.

(5) Autres :  $\square$  acide pyruvique formé comme substance finale (deuxième substance), voir brevet japonais N° 55-130687

20 (a) ADP, phospho-énolpyruvate et pyruvate kinase ;

(b) alanine,  $\alpha$ -cétoglutarate et transaminase glutamique-pyruvique (CTP) ;

(c) aspartate,  $\alpha$ -cétoglutarate et transaminase glutamique-oxoloacétique (GOT) et oxoloacétate  
25 décarboxylase ;

(d) glycérol, ATP, glycérol kinase et pyruvate kinase ;

(e) créatinine, créatininase, ATP, créatinphosphokinase et pyruvate kinase.

30 Pour que l'on obtienne des résultats bons et précis, la deuxième substance telle que le glucose, le galactose, le fructose, la choline, le glycérol, l'amido-acide et l'acide pyruvique doit être complètement formée et cette substance ne doit pas être mélangée initialement dans le constituant  
35 à déterminer. Une telle substance mélangée ou contaminante

est une cause d'erreur dans l'analyse. Généralement, un échantillon, sauf un échantillon étalon pour courbe de référence, est contaminé par mélange de la substance finale telle que le glucose et la choline.

5           Pour éviter l'erreur, on doit déterminer d'abord les impuretés mélangées telles que le glucose et le galactose et, après la fin de la détermination d'ensemble, on doit soustraire de la quantité totale la quantité trouvée initialement pour obtenir la quantité correcte. Ce sont  
10 des inconvénients. De plus, l'impureté mélangée telle que le glucose est oxydée initialement par traitement préalable par une oxydase telle que la glucose oxydase. Le traitement préalable par une oxydase présente aussi des inconvénients. Par exemple, l'oxygène soluble dans un échantillon est  
15 consommé par l'action de l'oxydase et de l'eau oxygénée est produite et ces phénomènes ont donc une influence sur la détermination finale. Le traitement préalable en utilisant une oxydase présente donc des inconvénients.

20           La demanderesse a trouvé qu'en présence de glucose mélangé, on peut effectuer la détermination du saccharose, du lactose, du maltose et de l'activité d'amylase en traitant l'échantillon contenant du glucose par l'hexokinase en présence d'ATP pour phosphorylation sous la forme de glucose-6-phosphate et par ce traitement on n'a pas trouvé  
25 de diminution de l'oxygène soluble ni d'eau oxygénée produite.

          Toutefois, dans ce traitement préalable, l'hexokinase restante est présente comme impureté dans le mélange de réaction final, ce qui cause une phosphorylation de la  
30 deuxième substance. Pour éviter cet effet du traitement préalable par l'hexokinase, il faut une dénaturation ou une élimination de l'hexokinase restante. Toutefois, une dénaturation par la chaleur ou par le pH entraînera la dénaturation de la substance à déterminer, et l'élimination de  
35 l'hexokinase est très difficile.

On a trouvé que pour éliminer le glucose initialement mélangé, on peut utiliser de l'hexokinase immobilisée pour l'élimination du glucose mélangé sans modification de la teneur en oxygène soluble et sans production d'eau oxygénée. L'échantillon ainsi traité est transformé en la deuxième substance qui est oxydée par l'oxydase correspondante, puis on mesure l'oxygène consommé ou l'eau oxygénée produite et ainsi le constituant dans l'échantillon peut être déterminé rapidement avec une bonne précision. De la même manière, on peut déterminer aussi le galactose et la choline.

Comme exemple d'un système de réaction pour détermination d'un constituant dans un échantillon selon la présente invention, on peut traiter l'échantillon par une ou plusieurs enzymes de manière à transformer le constituant présent dans l'échantillon en la deuxième substance par une seule étape ou plus de deux étapes de réaction, puis on oxyde la deuxième substance par l'oxydase correspondante et on mesure l'oxygène ainsi consommé ou l'eau oxygénée produite. Les systèmes de réaction enzymatique ne sont pas limités. Les exemples d'échantillons ne sont pas limités en ce qui concerne les échantillons contenant une deuxième substance initialement mélangée qui cause une erreur lors de la détermination, et on peut mentionner par exemple des échantillons pour diagnostic clinique comme de sérum et d'urine, un milieu de fermentation, un filtrat de culture, des matières premières alimentaires et des produits alimentaires.

Des exemples d'un constituant dans un échantillon sont des substances comme le saccharose, le lactose, l'amidon, le maltose, le phospholipide, la phosphorylcholine, une graisse neutre, le glycérol, l'acide lactique et la créatinine et des enzymes comme l'amylase, l'invertase, la  $\beta$ -galactosidase, l' $\alpha$ -glucosidase, la phospholipase-D, la phosphatase, la lipase, la lipoprotéine lipase, la leucine aminopeptidase, LDH, GPT, GOT, la pyruvate kinase,

la glycérokinase, l'acide oxalo-acétique décarboxylase, la créatininase et la créatine-phosphokinase.

La présente invention peut être appliquée pour détermination quantitative des substances ci-dessus et pour  
5 détermination de l'activité des enzymes ci-dessus et le système de réaction peut être choisi et multiplié.

La deuxième substance est la substance produite par l'étape unique ou les étapes multiples de la réaction sur la substance ou l'enzyme ci-dessus à déterminer, et ne  
10 doit pas être une substance identique au constituant présent dans l'échantillon soumis à la détermination. Des exemples de la deuxième substance sont la substance qui est produite par action enzymatique sur un constituant dans l'échantillon soumis à la détermination et qui peut  
15 être oxydée par l'oxydase correspondante, et ce sont le glucose, le galactose, la choline, le glycérol et l'acide pyruvique. Des exemples de ces deuxièmes substances, des enzymes et des substrats sont les suivants :

	<u>Deuxième substance</u>	<u>Enzyme</u>	<u>Substrat</u>
20	glucose	invertase	saccharose
	galactose, glucose	$\beta$ -galactosidase	lactose
	glucose	amylase, $\alpha$ -glucosidase	amidon
	choline	phospholipase D	phospholipide
25	"	phosphatase	phosphorylcholine
	"	choline estérase	benzoylcholine
	glycérol	lipase, lipoprotéine lipase	graisse neutre
	acide pyruvique	LDH	acide lactique
30	"	pyruvate kinase	phospho-énolpyruvate et ADP
	"	GPT	alanine et $\alpha$ -céto-glutarate
35	"	GOT et oxaloacétate décarboxylase	$\alpha$ -cétoglutarate et aspartate
	"	glycérol kinase, pyruvate kinase	glycérol et phospho-énolpyruvate et ATP



acide pyruvique	créatininase, créatinephosphokinase et pyruvate kinase	créatinine, ATP et phospho- énolpyruvate
-----------------	--	--

Quand on parle ici de deuxième substance mélangée,  
 5 Il s'agit d'une substance initialement mélangée ou coexistant  
 dans un échantillon soumis à une détermination qui est  
 identique à la deuxième substance.

La kinase correspondante pour la deuxième substance  
 mélangée est une enzyme de phosphorylation pour la deuxième  
 10 substance mélangée en présence de ATP. Des exemples sont  
 la glucokinase ou l'hexokinase pour le glucose comme  
 deuxième substance, la galactokinase pour le galactose,  
 l'hexokinase pour les autres hexoses, la cholinekinase pour  
 la choline, la glycérolkinase pour le glycérol et la  
 15 pyruvate kinase pour le pyruvate.

La préparation de la kinase immobilisée peut être  
 effectuée par une technique classique d'immobilisation  
 pour les enzymes. Des exemples préférables sont l'immobi-  
 lisation par l'acrylamide, la réticulation d'une protéine  
 20 après mélange de l'enzyme avec une protéine comme l'albu-  
 mine, l'emprisonnement par le collagène et la fibroïne ou  
 l'enchaînement par covalence à ces matières, l'adsorption  
 sur un polymère organique polyporeux ou l'enchaînement par  
 covalence à ce polymère et l'emprisonnement par photo-  
 25 polymérisation.

Des formes pour les enzymes immobilisées sont celles  
 de membranes, de fibres, de pastilles et de tubes.

L'oxydase correspondant à la deuxième substance est  
 au moins une enzyme qui catalyse l'oxydation en présence  
 30 d'oxygène et la production d'eau oxygénée.

Des exemples sont la glucose oxydase pour le glucose  
 comme deuxième substance, la galactose oxydase ou l'hexose  
 oxydase pour le galactose, l'hexose oxydase pour les autres  
 hexoses, la glycérol oxydase pour le glycérol, la choline  
 35 oxydase pour la choline et le pyruvate oxydase pour l'acide  
 pyruvique.

L'oxydase est utilisée de préférence sous la forme d'enzyme immobilisée et grâce à cette immobilisation on peut effectuer une analyse automatique par des moyens électrochimiques.

5 Des moyens électrochimiques de mesure de la réduction de la quantité d'oxygène ou de la production d'eau oxygénée dans un système de réaction sont la détection électrique de la variation de la quantité d'oxygène ou d'eau oxygénée. On peut utiliser de préférence une électrode à oxygène du  
10 type de Clark ou du type galvanique et une électrode à eau oxygénée. L'immobilisation de l'enzyme peut permettre des économies sur la quantité de la coûteuse enzyme. De plus, une électrode connectée à l'enzyme immobilisée par un détecteur électrique, par exemple une électrode à enzyme,  
15 comme une électrode à enzyme pour l'électrode à oxygène et une électrode à enzyme pour l'électrode à eau oxygénée, est particulièrement préférable en raison de la détection rapide, de ce qu'on n'a pas besoin de réactifs, d'une utilisation répétée et sans effet inhibiteur d'une substance colorée dans l'échantillon.  
20

Un mode de réalisation du dispositif pour la détermination sera illustré ci-après.

Des systèmes pour la détection sont un système à réacteur utilisant une colonne d'enzyme immobilisée ou un  
25 système à membrane utilisant une membrane immobilisée.

La figure 1 illustre le dispositif de détection par des moyens électrochimiques sur le système à réacteur.

Sur la figure 1, les références désignent les éléments suivants : 1 : récipient à solution tampon ; 2 :  
30 pompe ; 3 : injecteur d'échantillon ; 4 : colonne de kinase pour la deuxième substance ; 5 : colonne d'enzyme pour le constituant dans l'échantillon qui transforme le constituant en la deuxième substance ; 6 : colonne d'oxydase immobilisée correspondant à la deuxième substance ; 7 : électrode pour  
35 moyens électrochimiques ; 8 : cellule à écoulement ;

9 : amplificateur pour la variation du courant électrique venant de l'électrode ; 10 : enregistreur ; 11 : récipient à température constante ; 12 : le deuxième injecteur ; et 13 : évacuation.

5 Le deuxième injecteur, référence 12, n'est pas nécessaire quand on utilise une colonne d'enzyme immobilisée dans la colonne 5, et est utilisé pour injection d'une solution d'enzyme non-immobilisée pour transformation du constituant en la deuxième substance, ou pour injection  
10 de substrat pour détermination d'une activité d'enzyme.

Dans un mode de réalisation pour la détermination de lactose, on utilise : colonne 4 : hexokinase ou galactokinase immobilisée ; colonne 5 :  $\beta$ -galactokinase immobilisée ; colonne 6 : glucose oxydase ou galactose oxydase  
15 immobilisée ; et électrode 7 : électrode à oxygène ou électrode à eau oxygénée qui est connectée à la cellule à écoulement 8.

Dans un mode de réalisation pour la détermination de saccharose, on utilise : colonne 4 : hexokinase immobilisée ;  
20 colonne 5 : colonne doublement liée d'invertase et de nuto-rotase immobilisées ; colonne 6 : glucose oxydase immobilisée ; ou colonne 5 : invertase immobilisée et colonne 6 : mutarotase et glucose oxydase immobilisées.

Dans un mode de réalisation pour la détermination  
25 d'activité d'amylase, on utilise : colonne 4 : glucokinase ou hexokinase immobilisée ; colonne 5 :  $\alpha$ -glucosidase immobilisée et colonne 6 : glucose oxydase immobilisée.

La quantité de ces enzymes immobilisées dépend du débit du milieu de réaction, de la constante  $K_m$  de l'enzyme,  
30 de la quantité de deuxième substance mélangée et de la dilution de l'échantillon et elle n'est pas limitée ; de préférence on utilise de 20 à 200 mg (poids à l'état humide) d'enzyme immobilisée contenant de l'hexokinase  $\left[ \begin{array}{l} \text{plus de} \\ 100 \text{ U/g (poids à l'état humide)} \end{array} \right]$ , de la glucose oxydase  
35  $\left[ \begin{array}{l} \text{plus de 30 U/g (poids à l'état humide)} \end{array} \right]$ , de l'invertase

5 [plus de 200 U/g (poids à l'état humide)], de la mutarotase [plus de 800 U/g (poids à l'état humide)], de la  $\beta$ -galactosidase [plus de 30 U/g (poids à l'état humide)] ou de l' $\alpha$ -glucosidase [plus de 140 U/g (poids à l'état humide)].

Comme expliqué ci-après dans les exemples, 13,8 U (activité totale) d'hexokinase peuvent enlever 400 mg/dl de glucose dans l'échantillon.

10 Des exemples de solutions tampon dans le récipient à solution tampon sont un tampon à pH stable comme un tampon diméthylglutarate et un tampon phosphate. ATP peut être contenu dans la solution tampon pour phosphorylation par kinase. La quantité d'ATP est légèrement supérieure à la quantité de la deuxième substance dans l'échantillon. On  
15 peut ajouter des sels qui maintiennent l'enzyme stable. Des exemples sont le chlorure de magnésium, le chlorure de potassium ou le chlorure de manganèse.

Pour le fonctionnement, un volume constant de tampon est introduit à 0,1 - 2 cm<sup>3</sup>/min et stabilise le dispositif.  
20 Après la stabilisation, l'échantillon soumis à la détermination est injecté sous la forme d'une portion aliquote de 5 à 50  $\mu$ l en utilisant une microseringue et une micropipette. L'échantillon injecté est transféré à la colonne de kinase immobilisée et la deuxième substance mélangée est phosphorylée.  
25 La température durant la réaction est maintenue à environ 25-40°C, de préférence à 37°C. Le glucose mélangé, par exemple, est éliminé par transformation en glucose-6-phosphate. L'échantillon est passé à la colonne suivante et est transformé en la deuxième substance. Par exemple, le sac-  
30 charose ou le lactose à déterminer est transformé enzymatiquement en glucose comme deuxième substance par une enzyme, de préférence une enzyme immobilisée.

Dans le cas d'une enzyme non-immobilisée, la solution de l'enzyme est injectée dans le deuxième injecteur 12. Pour  
35 déterminer une activité d'enzyme, l'opération est différente suivant le nombre d'étapes de réaction enzymatique,

c'est-à-dire suivant qu'il s'agit d'une réaction en une seule étape ou de réactions en deux étapes ou plus. Dans une réaction enzymatique en une seule étape, si on injecte un substrat dans l'injecteur d'échantillon, ce substrat est passé à travers la colonne de kinase et donc ce substrat est altéré par la kinase, ce qui cause un résultat inattendu. En conséquence, le substrat doit être injecté dans le deuxième injecteur 12. Dans une réaction enzymatique à deux étapes ou plus, le substrat est traité dans une colonne de première étape pour détermination de l'activité enzymatique et le substrat traité est soumis à une autre action enzymatique ou à l'action d'une autre réactif pour être transformé en la deuxième substance. Dans ce cas, à la première étape, le substrat n'est pas soumis à l'action de la kinase, et donc le substrat peut être injecté dans la solution tampon ou injecté dans le deuxième injecteur. Le substrat est transformé en la deuxième substance dans la deuxième étape ou une étape suivante.

La deuxième substance est oxydée par la colonne d'oxydase immobilisée. La solution de corps en réaction est introduite dans la cellule à écoulement, à un volume d'environ  $0,05 - 0,5 \text{ cm}^3$ , et l'électrode connectée détecte l'oxygène consommé ou l'eau oxygénée produite et l'indique sous la forme d'une variation de courant électrique qui est enregistrée à travers un amplificateur.

Dans le système à réacteur ci-dessus, la colonne 6 et l'électrode 7 peuvent être remplacées par une électrode à enzyme de la même oxydase immobilisée placée à la partie détectrice de l'électrode. On peut utiliser de préférence un système détecteur multiple qui rassemble les diverses électrodes à enzyme dans un seul système. Dans le système, dans une partie de la colonne 5, la colonne à enzyme immobilisée correspondante est connectée.

De plus, dans ce dispositif, un dispositif automatique commandé par calculatrice ou ordinateur peut être installé. Par exemple, l'injection de l'échantillon est

effectuée par un dispositif automatique, chaque valve est du type électromagnétique et, en ce qui concerne les autres accessoires, on peut installer un micro-ordinateur équipé de canaux pour entrée et commande automatique, etc., connectés à un tableau d'affichage et à un tableau de commande qui affichent et qui font entrer le cours de la réaction en fonction du temps, les conditions et d'autres éléments, et le dispositif est commandé automatiquement par l'ordinateur à travers l'interface.

Les exemples suivants illustrent la présente invention, mais ne doivent pas être considérés comme la limitant.

#### Exemple 1

(1) Enlèvement de la deuxième substance mélangée, le glucose, par l'hexokinase immobilisée :

Sur la figure 1, une solution tampon contenant 3mM ATP et 2 mM chlorure de magnésium dans 0,1 M tampon diméthylglutarate (pH 6,5) est préparée dans le récipient 1 à solution tampon. Le débit de la pompe 2 est réglé à 1 cm<sup>3</sup>/min. Injecteur d'échantillon : 3. Colonne 4 : (2,8 x 30 mm) hexokinase immobilisée (138 U/g, poids à l'état humide, 100 mg). Colonne 5 : (2,8 x 30 mm)  $\beta$ -galactosidase immobilisée (35 U/g, poids à l'état humide, 100 mg). Colonne 6 : (2,8 x 15 mm) glucose oxydase immobilisée (70 U/g, poids à l'état humide, 50 mg). Electrode 7 : électrode à oxygène connectée à la cellule à écoulement 8 ((vol. 0,1 cm<sup>3</sup>). On maintient une température constante de 37°C. L'électrode à oxygène est connectée à un enregistreur numérique 10 à travers l'amplificateur 9. (Le dispositif est prévu pour détermination de lactose).

La solution tampon est refoulée par la pompe au débit de 1 cm<sup>3</sup>/min. Après confirmation de la stabilisation de l'oxygène soluble par l'électrode à oxygène qui est placée dans la cellule à écoulement, on injecte dans l'injecteur d'échantillon 5  $\mu$ l de chaque concentration aliquote de solution normalisée de glucose (100, 200, 300, 400, 500, 600

et 700 mg/dl). La solution normalisée de glucose est transférée dans la colonne d'hexokinase immobilisée dans laquelle le glucose est transformé en glucose-6-phosphate par ATP. S'il reste du glucose, la quantité d'oxygène soluble dans la solution normalisée est réduite par oxydation dans la colonne de glucose oxydase immobilisée. La réduction de la quantité d'oxygène est enregistrée par l'électrode à oxygène sous la forme d'une variation de courant à travers l'amplificateur. Comme on le voit sur la figure 2, l'hexokinase (activité totale 13,9 U) peut enlever au moins 400 mg/dl de glucose mélangé. En conséquence, au moins 800 mg/dl de glucose mélangé peuvent être enlevés par 30 U d'hexokinase.

On obtient le même résultat en remplaçant la  $\beta$ -galactosidase immobilisée de la colonne 5 par une colonne sans  $\beta$ -galactosidase.

(2) Détermination du lactose dans un échantillon contenant du lactose mélangé avec du glucose

On utilise le même dispositif et les mêmes conditions que dans l'exemple 1. Débit du tampon :  $1 \text{ cm}^3/\text{min}$ . Après stabilisation de la quantité d'oxygène soluble, on injecte l'échantillon (5  $\mu\text{l}$ ). Echantillon : concentration aliquote de lactose (100, 200, 300, 400 et 500 mg/dl) contenant du glucose (300 mg/dl). Témoin : même concentration de lactose, mais sans glucose. Le glucose injecté dans l'échantillon est transformé en glucose-6-phosphate par action de la colonne d'hexokinase immobilisée et le lactose est hydrolysé par la colonne de  $\beta$ -galactosidase immobilisée et est ainsi transformé en glucose. Le glucose est oxydé par la colonne de glucose oxydase immobilisée et on enregistre la variation de courant électrique causée par la réduction de la quantité d'oxygène soluble.

Le résultat est représenté sur la figure 3, où  $\bullet\text{---}\bullet$  = échantillon contenant du glucose et  $\circ\text{---}\circ$  = échantillon témoin sans glucose. Comme on le voit, le lactose est déterminé avec une bonne précision même en présence de

glucose.

(3) Détermination du saccharose dans un échantillon

contenant du saccharose mélangé avec du glucose

Dans le dispositif ci-dessus de détermination de

5 lactose, la colonne de  $\beta$ -galactosidase immobilisée est remplacée par une colonne d'invertase immobilisée (2950 U/g, poids à l'état humide, 100 mg (2,8 x 30 mm) et la colonne de glucose oxydase immobilisée est remplacée par de la glucose oxydase et de la mutarotase immobilisées simulta-  
10 nement (glucose oxydase 43 U/g, poids à l'état humide, mutarotase 1200 U/g, poids à l'état humide, 50 mg) (2,8 x 15 mm). On utilise une solution tampon constituée de 3mM ATP et 2 mM chlorure de magnésium contenant 0,1 M tampon phosphate (pH 7,0).

15 Echantillon : chaque concentration aliquote de saccharose (100, 200, 300, 400 et 500 mg/dl) contenant 300 mg/dl de glucose.

Témoin : solution de saccharose sans glucose.

L'opération est effectuée de la même manière que  
20 ci-dessus et le résultat est représenté sur la figure 4. Sur la figure, •—• : échantillon avec glucose, —•— : témoin sans glucose.

Comme on le voit, le saccharose peut être déterminé même en présence de glucose.

25 (4) Détermination de l'amylase dans un échantillon

contenant de l'amylase mélangée avec du glucose

Dans le dispositif ci-dessus de détermination de

lactose, la colonne de  $\beta$ -galactosidase immobilisée est remplacée par une colonne d' $\alpha$ -glucosidase immobilisée (160 U/g,  
30 poids à l'état humide, 100 mg) (2,8 x 30 mm). On utilise une solution tampon constituée de 3 mM ATP et 2 mM chlorure de magnésium contenant 0,1 M tampon phosphate (pH 7,0).

Substrat : amidon soluble dans 0,1 M tampon phosphate

(pH 7,5) (500 mg/d). Solution d' $\alpha$ -amylase : chaque concen-  
35 tration aliquote d' $\alpha$ -amylase (produit de Boehringer G.m.b.H.,  $\alpha$ -amylase de pancréas de porc, 100 U/ml : 1, 2, 3, 4, 5, 6



ml/litre) contenant du glucose, 200 mg/dl.

La solution d' $\alpha$ -amylase (10  $\mu$ l) est ajoutée dans la solution de substrat (100  $\mu$ l) et on fait incuber à 37°C pendant 10 minutes. On introduit la solution tampon à un débit de 1 cm<sup>3</sup>/min. Après stabilisation de l'oxygène soluble, l'échantillon ci-dessus ayant subi l'incubation (5  $\mu$ l) est injecté dans l'injecteur d'échantillon.

La maltose produit à partir de l'amidon par l' $\alpha$ -amylase est décomposé en glucose dans la colonne d' $\alpha$ -glucosidase immobilisée et le glucose est oxydé par la colonne de glucose oxydase immobilisée, et on enregistre alors la variation de courant électrique causée par la réduction de la quantité d'oxygène soluble.

Le glucose mélangé est transformé en glucose-6-phosphate par la colonne d'hexokinase immobilisée et, s'il est complètement transformé, on n'observera pas d'effet sur la variation du courant électrique. Le résultat est représenté sur la figure 5 et on voit qu'il est bon.

#### Exemple 2

Dans le dispositif de détermination d'activité d' $\alpha$ -amylase de l'exemple 1-(4), on détermine l'activité d' $\alpha$ -amylase d'un échantillon témoin irrégulier de sérum (nom commercial seraclea NA, Nihon Shoji Co.,  $\alpha$ -amylase : 1360 IU/l, glucose 230 mg/dl). La durée d'incubation du substrat et de l'échantillon est de 10 minutes, 20 minutes et 30 minutes. Chaque portion de 20  $\mu$ l d'échantillon est injectée dans l'injecteur. On opère de la même manière que dans l'exemple 1-(4). Témoin : solution tampon sans ATP.

Le résultat est représenté sur la figure 6, où  
•—• : solution tampon avec ATP, o—o : témoin sans ATP.  
Dans le cas du témoin sans ATP, aucune transformation de glucose en glucose-6-phosphate ne se produit pour fournir une plus forte variation du courant électrique, et dans le cas de la solution tampon sans ATP, aucun effet du glucose n'est observé et les variations du courant électrique sont proportionnelles à la durée de réaction. L'activité

d' $\alpha$ -amylase dans le sérum peut être déterminée avec une bonne précision.

Les activités d' $\alpha$ -amylase dans des sérums de sang humain inconnus sont déterminées, avec le témoin ci-dessus, par rapport à un nécessaire disponible dans le commerce (nom commercial : amylase test Daiichi). Les résultats des deux déterminations sont identiques (détermination selon la présente invention : 185 UI/litre, avec le nécessaire disponible dans le commerce : 181 UI/litre).

10 Exemple 3

On détermine le saccharose dans un filtrat de culture en utilisant le dispositif de détermination de saccharose de l'exemple 1-(3).

On recueille un liquide de culture après un certain nombre de temps de culture (à l'instant initial : mélasse 25%, milieu de culture de levures). Le liquide surnageant de la culture est dilué au coefficient 10 par addition d'eau. On injecte 5  $\mu$ l d'échantillon dans l'injecteur d'échantillon. On opère de la même manière que l'exemple 1-(3). La concentration de saccharose indiquée par la variation de courant électrique est calculée au moyen de la courbe de référence de la figure 4. On utilise aussi pour le même échantillon un nécessaire pour détermination de saccharose disponible dans le commerce (Boehringer G.m.b.H., nécessaire F, saccharose/glucose, lot. 139041, méthode d'absorption UV). Le résultat est présenté sur la figure 7, où "—": résultat de la détermination selon la présente invention, "°—°": résultat de la détermination avec le nécessaire disponible dans le commerce.

En dépit de la présence de glucose mélangé dans la mélasse, le saccharose dans le liquide de culture peut être déterminé. Dans la méthode de détermination par absorption UV dans un nécessaire pour détermination disponible dans le commerce, le glucose préalablement mélangé est oxydé par la glucose oxydase pour élimination du glucose. L'élimination du glucose selon la présente invention demande seulement

2 minutes, tandis qu'avec le nécessaire pour détermination disponible dans le commerce il faut 75 minutes pour l'élimination du glucose et ensuite 15 minutes pour la dénaturation de la glucose oxydase. De plus, de l'oxygène soluble constant doit être assuré et il faut un réglage du pH si nécessaire. En plus de ces opérations compliquées, l'effet d'une substance colorée dans l'échantillon cause une erreur dans la détermination. Tandis qu'avec la présente invention, simple à mettre en oeuvre, permettant une détermination rapide, il n'y a pas d'erreur causée par les substances colorées et on peut obtenir une détermination précise.

#### Brève explication des dessins

Figure 1 : dispositif de détermination. 1 : récipient à solution tampon, 2 : pompe, 3 : injecteur d'échantillon, 4 : colonne de kinase immobilisée correspondant à la deuxième substance, 5 : colonne pour transformer le constituant dans l'échantillon en la deuxième substance, 7 : électrode pour des moyens électrochimiques, 8 : cellule à écoulement, 9 : amplificateur, 10 : enregistreur, 11 : récipient à température constante, 12 : deuxième injecteur, 13 : évacuation.

Figure 2 : courbe de capacité d'enlèvement de la deuxième substance mélangée, le glucose, par l'hexokinase immobilisée dans l'exemple 1-(1).

Figure 3 : courbe de détermination du lactose dans un échantillon contenant du glucose mélangé dans l'exemple 1-(2).

Figure 4 : courbe de détermination du saccharose dans un échantillon contenant du glucose mélangé dans l'exemple 1-(3).

Figure 5 : courbe de détermination de l'activité d' $\alpha$ -amylase dans un échantillon contenant du glucose mélangé dans l'exemple 1-(4).

Figure 6 : courbe de détermination de l'activité

d'amylase dans du sérum dans l'exemple 2.

Figure 7 : courbe de détermination du saccharose  
dans un filtrat de culture dans l'exemple 3.

REVENDICATIONS

1. Dans un procédé de détermination d'un constituant dans un échantillon, où l'échantillon contient initialement une substance mélangée qui influe sur la détermination pour causer une erreur, procédé selon lequel on soumet à une transformation la substance soumise à la détermination dans une détermination de constituant dans un échantillon de manière à former une deuxième substance et on oxyde cette deuxième substance en utilisant l'oxydase correspondante, un perfectionnement selon lequel :
- 10        on phosphore la deuxième substance mélangée dans l'échantillon par une kinase immobilisée correspondante pour cette deuxième substance mélangée et ATP,
- on transforme la substance à déterminer dans l'échantillon de manière à former la deuxième substance,
- 15        on oxyde la deuxième substance ainsi formée en utilisant une oxydase correspondante et
- on mesure l'oxygène consommé ou l'eau oxygénée produite dans une réaction.
2. Perfectionnement selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'oxydase pour la deuxième substance est une enzyme immobilisée.
- 20        3. Perfectionnement selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'on mesure par des moyens électrochimiques l'oxygène consommé ou l'eau oxygénée produite.
- 25        4. Perfectionnement selon la revendication 3, caractérisé en ce que les moyens électrochimiques sont une électrode à oxygène, une électrode à eau oxygénée ou une électrode à enzyme appropriée.
- 30        5. Perfectionnement selon la revendication 1, caractérisé en ce que la kinase dans l'enzyme immobilisée est la glycérol kinase, la pyruvate kinase, la choline kinase, la glucokinase, la galactokinase ou l'hexokinase.
6. Perfectionnement selon la revendication 1,

caractérisé en ce que l'oxydase pour la deuxième substance est la glycérol oxydase, la pyruvate oxydase, la choline oxydase, la glucose oxydase, la galactose oxydase ou l'hexose oxydase.

FIG. 1

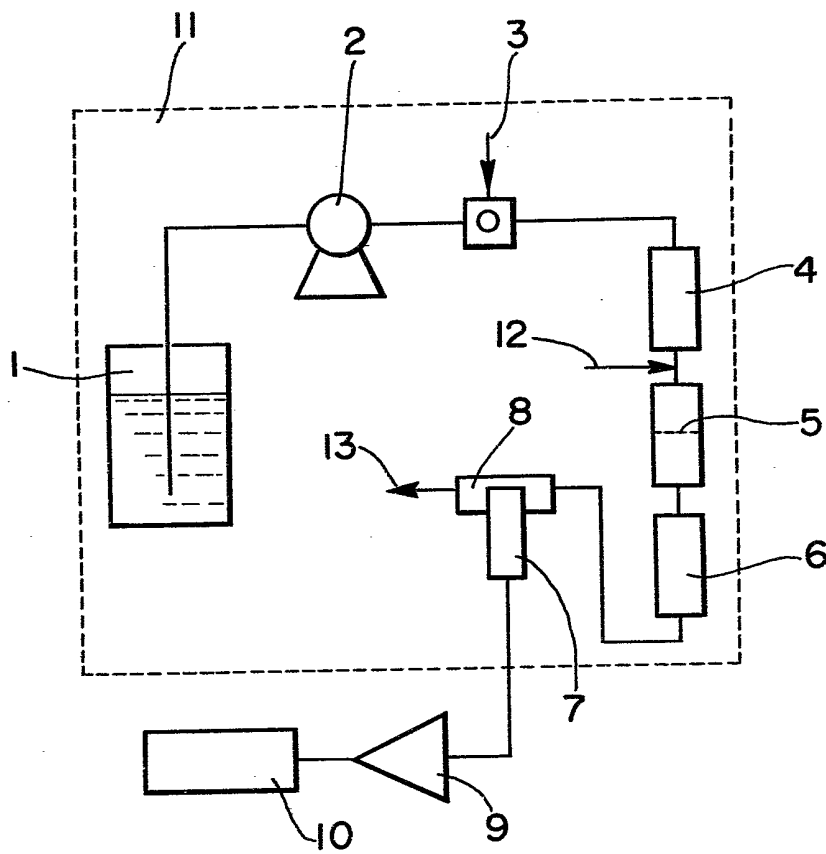


FIG. 2

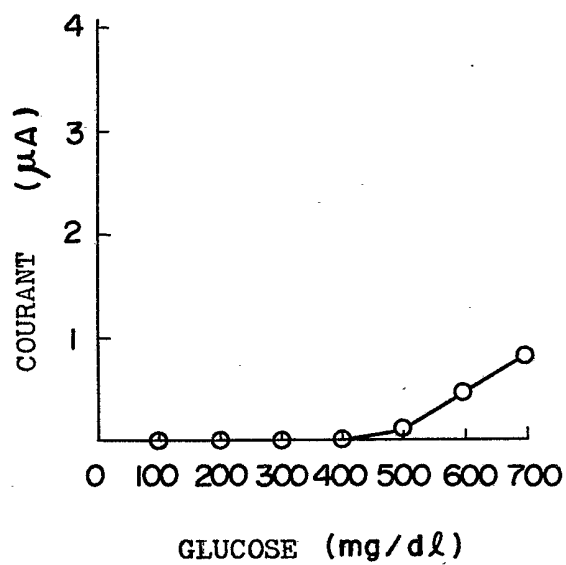


FIG. 4

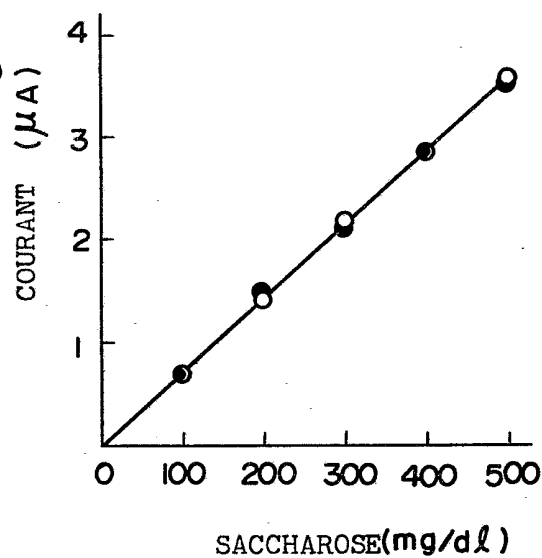


FIG. 3

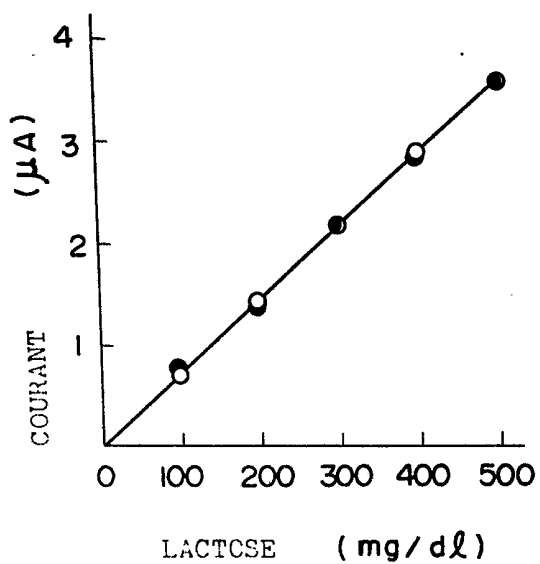




FIG. 5

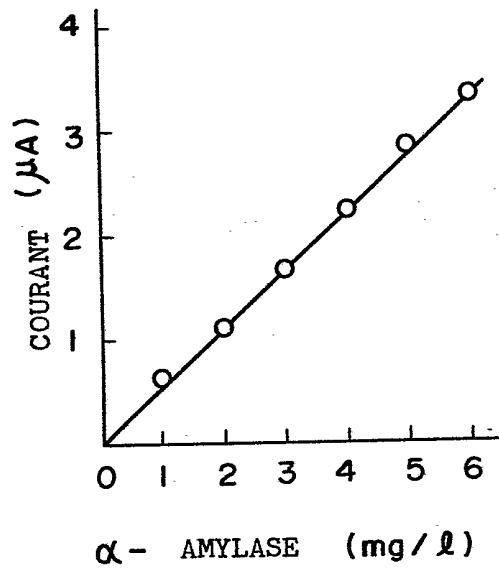


FIG. 7

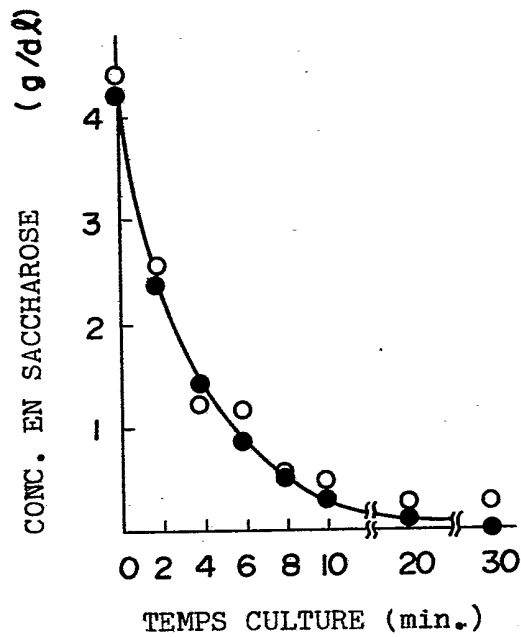


FIG. 6

